棉铃虫卵巢形态与卵子发生过程观察

张万娜[1]，肖海军[1,2]，梁革梅[1]，郭予元[1,*]
(1. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193；
2. 江西农业大学昆虫研究所，南昌 330045)

摘要：害虫发生高峰期、发生量的准确预测和田间防治适期的确定与种群雌虫卵巢结构及卵子发生过程密切相关。为了明确棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 卵巢结构及卵子发生过程，本研究利用光学体视显微镜和透射电子显微镜，对棉铃虫成虫卵巢管和卵子的超微结构进行了研究，并确定了发育级别划分标准。结果表明：根据卵巢的形状、卵的产生过程、卵黄沉积情况等将棉铃虫卵巢发育程度分为 6 个级别，即发育初期(0 级)、卵黄沉积前期(Ⅰ级)、卵黄沉积期(Ⅱ级)、成熟待产期(Ⅲ级)、产卵盛期(Ⅳ级)和产卵末期(Ⅴ级)。根据卵子发生过程中滋养细胞、卵母细胞的变化，将卵子发生期分为 3 个阶段：卵黄发生前期、卵黄发生期和卵黄成熟期。本研究首次对棉铃虫的卵子发生进行电子显微观察，并完善了棉铃虫卵巢发育的分级标准，为进一步研究棉铃虫的生殖发育机理提供了理论参考，对田间棉铃虫种群发生期和发生量的预测预报也有重要的实践参考价值。

关键词：棉铃虫；卵巢；形态；超微结构；发育级别；卵子发生
中图分类号：Q964 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2013)04-0358-07

Observation on ovarian morphology and oogenesis in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

ZHANG Wan-Na[1], XIAO Hai-Jun[1,2], LIANG Ge-Mei[1], GUO Yu-Yuan[1,*] (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Institute of Entomology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: The ovarian structure as well as oogenesis is closely related with the accurate forecast of the pest occurrence peak and the appropriate control time. In order to make sense of the ovarian structure and oogenesis in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, we investigated both the ovarian structure and oogenesis of *H. armigera* female moth under the light microscopy and transmission electron microscopy, and determine the grading criteria to divide different developmental stages. According to the morphological characteristics of ovaries, the formation of eggs in the lateral oviducts and the characteristics of yolk deposition, the *H. armigera* ovaries are graded into 6 stages, including stage 0 (the initial stage), stage Ⅰ (yolk deposition prophase), stage Ⅱ (yolk deposition phase), stage Ⅲ (egg maturation phase), stage Ⅳ (peak phase of oviposition) and stage V (terminal phase of oviposition). According to the ultrastructural change of the oocytes and follicular cells, the developmental period of oogenesis is divided into 3 stages: the vitellogenesis prophase, vitellogenesis stage and yolk maturation stage. This study is the first research about oogenesis of *H. armigera* using electron microscopy, which optimizes the grading criteria of ovarian development of the cotton bollworm. The result provides an important theoretical basis for further study of reproductive development of *H. armigera*, and also has important practical meaning for the accurate forecast of outbreak date and scale in pest management.

Key words: *Helicoverpa armigera*; ovary; morphology; ultrastructure; developmental stage; oogenesis

昆虫雌性生殖系统(reproductive system)是具有产生卵子、提供受精场所、产卵等繁殖功能的器官。卵巢的生理功能包括贮存和增殖生殖细胞(卵子)，吸收必要的营养物质，使卵子在一定时期内达到成熟阶段，卵子受精后产出体外(Davey, 1985)。因此，对其结构的了解是研究昆虫生殖生

基金项目：国家科技支撑计划课题(2012BAD19B05)
作者简介：张万娜，女，1988 年生，河南新乡人，硕士研究生，研究方向为昆虫生理生化与分子生物学，E-mail：zhangwanna880210@yeah.net
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：yuyuanguo@hotmail.com
收稿日期 Received：2012-12-26；接受日期 Accepted：2013-03-20

理的首要条件。昆虫卵巢的发育和卵子发生过程的研究对害虫种群发生期和发生量的预测预报也具有重要的实践意义(Girardie and Girardie, 1998；吴孔明等, 2002；Feng *et al.*, 2009；齐国君等, 2011)。通过分析卵巢的发育进度可为害虫种群动态的准确预测预报、确定害虫防治适期提供参考，从而提高防治效果，减少农药的使用次数(张孝羲等, 1979；李立涛等, 2012)。

大多数昆虫的卵巢都有4～10根管状的卵巢管组成，并且根据卵母细胞在发育过程中获得营养的方式，可把卵巢管分为无滋式(panoistic type)、端滋式(telotrophic type)和多滋式(polytrophic type)。鳞翅目昆虫的卵巢管类型属于多滋式，卵巢管内的卵母细胞与滋养细胞交替出现。以前的报道中通常将昆虫的卵巢发育分为4～5个级别，主要是依据脂肪体颜色、卵黄沉淀的水平、卵巢管发育水平、受精囊、附腺等发育情况进行分级(钱仁贵, 1982；李汝铎, 1987；王宪辉等, 2003)。昆虫的远距离迁飞以及迁飞后的生殖与卵巢的发育有着密不可分的联系(姚青和张志涛, 1999；吴孔明和郭予元, 2002)，因此，通过解剖卵巢，利用卵巢分级方法系统地对季节性迁飞过程中专性或兼性迁飞害虫的卵巢发育程度进行监测观察分析，可以明确远距离迁飞性昆虫的虫源性质，是研究害虫发生规律及准确进行害虫种群发生量预测预报的重要手段(Chen *et al.*, 1989；林昌善, 1990；Zhao *et al.*, 2009)。

卵巢发育的一个重要过程就是卵子发生，主要是卵母细胞吸取大量的物质使得其体积明显变大，这些物质既有从其他组织摄取的，也有本身合成的(Hagedorn *et al.*, 1998)，这些物质沉积在卵内并为胚胎发育提供营养。随着昆虫生殖生理的深入研究，对昆虫卵巢结构的解剖观察已经发展到电子超微结构水平(Gullan and Cranston, 2005)。如研究人员通过透射电镜来观察膜翅目和直翅目昆虫卵巢发育的过程中卵粒内部超微结构的变化、卵母细胞的形成、卵黄蛋白的沉积及其周围细胞组织的变化等(Margolis and Spradling, 1995；Dong *et al.*, 2010；马娜和花保祯, 2010；Guo *et al.*, 2011)。关于鳞翅目昆虫超微结构的研究则大多集中在对脂肪体的研究(Locke, 1984；Haunerl and Shirk, 1995)。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)是一种世界性分布的重要农业害虫(郭予元, 1998)，具有兼性迁飞习性。20世纪90年代初，棉铃虫灾害性暴发与其取食性广、个体繁殖能力强、群体具有较强的迁飞能力等生物学特性密切相关。吴孔明等(2002)基于害虫预测预报方法，对环渤海湾地区棉铃虫成虫的卵巢发育特点进行了研究，简要描述了不同日龄雌虫卵巢发育过程，并探讨了卵巢发育与迁飞的关系。进一步系统观察棉铃虫的卵巢形态和卵子发生过程，可为以后系统研究棉铃虫的卵巢和胚胎发育奠定基础，亦可为生产实践中棉铃虫种群发生期和发生量的预测预报和适时开展防治提供参考。因此，本文利用光学显微镜和电子显微镜技术对棉铃虫的卵巢发育形态变化进行了系统解剖观察，并系统观察了卵子形成的超微结构。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

供试棉铃虫于1996年6月采自河南省新乡县棉田，在实验室内用人工饲料(梁革梅等, 1999)饲养至今，未接触过任何杀虫剂。饲养条件：温度27±2℃，相对湿度75%±10%，光周期14L∶10D下饲养，并定期观察棉铃虫的发育进度。

1.2　成虫的饲养及取样

待蛹进入黑蛹期后，每天8:30随机挑出化蛹10日的雌蛹进行解剖直至羽化。然后将同一天羽化的棉铃虫成虫群体饲养在边长为30 cm的正方体养虫笼内，以10%蜂蜜水为其补充营养。每天8:30随机取10头同一天羽化的雌成虫按照不同日龄(羽化1, 2, 3, 4, 5, 6, 7和8 d)进行解剖，观察卵巢发育情况。

1.3　卵巢解剖

首先将选出的棉铃虫雌蛹和雌成虫放入指形管中，然后用纯 CO_2 气体将成虫轻度麻痹，再用眼科手术剪将其翅和足去除。蛹则直接用眼科手术剪将将其体壁挑剪开。虫体转入蜡盘内，用昆虫针进行固定，从尾部向前沿背部中线剪开，用昆虫针将拉开的体壁固定在虫体两侧，最后用钩针挑出卵巢，去除多余脂肪体等，再用XTZ-AT三目连续变倍体视显微镜(上海光学仪器厂)进行显微观察和拍照，根据显微观察和拍照结果，卵巢发育初步分级参考李汝铎(1987)和林昌善(1990)的方法。

1.4　透射电镜观察

将羽化3 d的棉铃虫雌成虫在解剖镜下解剖，分别取出卵巢管中不同发育阶段的卵粒和原卵区(用2%戊二醛前固定，用1%锇酸进行后固定)，每个组织3个重复。

2003)。我们的观察发现，棉铃虫的卵巢管的数目与大多数鳞翅目昆虫一样，为4 对，卵巢管的发育与其他夜蛾科昆虫一样，在蛹后期发育比较快，在成虫羽化2 –3 d 后，卵巢管的长度基本趋于稳定，这可能与鳞翅目昆虫属于多滋式卵巢有关(Kaulenas, 1992)。在棉铃虫成虫羽化后，卵巢的发育可分为卵黄沉积前期(Ⅰ级)、卵黄沉积期(Ⅱ级)、成熟待产期(Ⅲ级)、产卵盛期(Ⅳ级)和产卵末期(Ⅴ级)。但是，在棉铃虫蛹末期(第 13 天)，卵巢的基本结构已经形成，整个卵巢呈均匀透明，卵巢管正处在生长期，端部原卵区近筒状，中部略微膨大，卵巢管基部有明显的卵室，卵室透明，无卵黄沉积(图 3：A)。鉴于此时卵巢没有丝状脂肪体的缠绕，解剖中也比较容易得到完整的卵巢，其结构特征与成虫期各级卵巢有明显区别，因此，我们将这个时期的级别定为 0 级。本文进一步细化了棉铃虫卵巢发育的分级标准，简化了分级的指标，更利于快速、准确地判定棉铃虫卵巢的发育级别。

昆虫的卵子形成过程是卵巢发育中一个复杂的过程(Xu *et al.*, 2002)，不仅受到体内激素水平的影响，而且受到营养状况、温度和湿度等外界因子的影响(Wheeler, 1996)。很多种类昆虫卵子的发生是典型的依赖营养的过程，只有提供充足的营养才能启动和完成这个过程。本研究表明棉铃虫的卵子发生过程与直翅目昆虫中的卵子发生过程相似，都主要分为3 个阶段，与卵子发生分为5 个阶段的膜翅目昆虫不同(Dong *et al.*, 2010)。棉铃虫卵子发生过程中，卵黄颗粒的形成占了卵子发生的大部分阶段，卵黄物质大多是作为胚胎发育的营养源，是胚胎顺利发育完成的保障，可见卵黄形成在棉铃虫卵子发生中起到重要的作用。此外卵子发生时期，许多细胞器都参与了卵黄蛋白的形成，例如线粒体、高尔基体、内吞细胞都发生了变化。在卵黄沉积期，这些细胞器的活力开始增强，数量开始增多，这些特征同许多膜翅目、直翅目等昆虫的卵子发生类似(Dong *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2011)。通过观察表明，棉铃虫的卵巢管结构的变化在超微结构上反映着棉铃虫卵子的发生过程，通过卵黄蛋白的沉积,卵母细胞趋于成熟，促进了棉铃虫的卵巢管内卵粒的发育和成熟，为以后卵粒内的胚胎发育提供了营养。在透射电镜制样中，除了对不同发育阶段的卵粒进行电镜观察外，我们对卵巢管前段的卵原区也进行了制样，但是，电镜观察显示卵巢管前段的卵原区只显示出外膜轮廓，而内部结构不清晰(图2：B)，这是由于实验时卵原区取样靠近附腺区取样的失误致使，在今后的实验中需要改正。明确棉铃虫卵子发生的过程，不仅可以丰富鳞翅目昆虫生殖发育的理论基础，也为进一步深入研究调控卵子发生的生理和分子机制提供了参考。

在研究中我们发现，棉铃虫成虫日龄相差 1 d 时，其卵巢发育进度存在重叠的现象；而且同一日龄的棉铃虫成虫卵巢发育进度存在个体差异。这些现象在其他昆虫中也广泛存在(皇甫伟国等, 2007；李立涛等, 2012)。

致谢　感谢中国农业科学院农产品加工研究所郝宏京老师对电镜切片、拍照等工作的指导与帮助。

参考文献(References)

Chen RL, Bao XZ, Drake VA, Farrow RA, Wang SY, Sun YJ, Zhai BP, 1989. Radar observations of the spring migration into northeastern China of the oriental armyworm *Mythimna separata* and other insects. *Ecol. Entomol.*, 14: 149 –162.

Davey KG, 1985. The female reproductive tract. In: Kerkut GA, Gilbert LI eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Vol. 1. Pergamon Press, Oxford. 15 –36.

Dong SZ, Ye GY, Guo JY, Yu XP, Hu C, 2010. Oogenesis and programmed cell death of nurse cells in the endoparasitoid, *Pteromalus puparum*. *Microsc. Res. Techniq.*, 73(7): 673 –680.

Feng HQ, Wu XF, Wu B, Wu KM, 2009. Seasonal migration of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) over the Bohai Sea. *J. Econ. Entomol.*, 102(1): 95 –104.

Girardie J, Girardie A, 1998. Endocrine regulation of oogenesis in insects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 839: 118 –122.

Gullan PJ, Cranston PS, 2005. The Insects: An Outline of Entomology. 3rd ed. Blackwell Publishing, Oxford. 505 pp.

Guo JY, Dong SZ, Ye GY, Li K, Zhu JY, Fang Q, Hu C, 2011. Oosorption in the endoparasitoid, *Pteromalus puparum*. *J. Insect Sci.*, 11(90): 1 –8.

Guo YY, 1998. Studies on the Cotton Bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). China Agriculture Press, Beijing. [郭予元, 1998. 棉铃虫的研究. 北京: 中国农业出版社]

Hagedorn HH, Maddison DR, Tu ZJ, 1998. The evolution of vitellogenins, cyclorrhaphan yolk proteins and related molecules. *Adv. Insect Physiol.*, 27: 335 –384.

Haunerland NH, Shirk PD, 1995. Regional and functional differentiation in the insect fat body. *Ann. Rev. Entomol.*, 40: 121 –145.

Huangfu WG, Wei SJ, Zheng HH, Liu PC, Huang W, Shi ZH, Chen XX, 2007. Ovarian development of *Agrilus auriventris* Saunder (Coleoptera: Buprestidae). *Acta Entomol. Sin.*, 50(7): 682 –688. [皇甫伟国, 魏书军, 郑宏海, 刘鹏程, 黄蔚, 施祖华, 陈学新, 2007. 柑桔爆皮虫卵巢发育动态. 昆虫学报, 50(7):

682 – 688]

Kaulenas MS, 1992. Insect accessory reproductive structures: function, structure, and development. In: Bradshaw SD, Burggren W, Heller HC, Ishii S, Langer H, Randall D, Neuweiler G eds. Zoophysiology, Vol. 31. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K. 82 – 95.

Li LT, Wang YQ, Liu L, Gan YJ, Dong ZP, Ma JF, 2012. Grading criteria for assessing the ovarian development of *Athetis lepigone* and its use in forecasting. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(4): 1043 – 1047. [李立涛, 王玉强, 刘磊, 甘耀进, 董志平, 马继芳, 2012. 二点委夜蛾卵巢发育分级及在预测预报中的应用. 应用昆虫学报, 49(4): 1043 – 1047]

Li RD, Wang JQ, Su DM, 1987. Ovarian Development of Insects and Pest Forecast. Fudan University Press, Shanghai. 31 – 84. [李汝铎, 王金其, 苏德明, 1987. 昆虫卵巢发育与害虫预测预报. 上海: 复旦大学出版社. 31 – 84]

Liang GM, Tan WJ, Guo YY, 1999. An improvement in artificial rearing technique of *Helicoverpa armigera*. *Plant Protection*, 25(2): 15 – 17. [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元, 1999. 人工饲养棉铃虫技术的改进. 植物保护, 25(2): 15 – 17]

Lin CS, 1990. The Physiology and Ecology of the Oriental Armyworm. Peking University Press, Beijing. [林昌善, 1990. 粘虫生理生态学. 北京: 北京大学出版社]

Locke M, 1984. The structure and development of the vacuolar system in the fat body of insects. In: King RC, Akai H eds. Insect Ultrastructure, Vol. 2. Plenum Press, New York. 151 – 197.

Ma N, Hua BZ, 2010. Structure of ovarioles and oogenesis in *Panorpa liui* Hua (Mecoptera: Panorpidae). *Acta Entomol. Sin.*, 53(11): 1220 – 1226. [马娜, 花保祯, 2010. 刘氏蝎蛉卵巢管结构和卵子发生. 昆虫学报, 53(11): 1220 – 1226]

Margolis J, Spradling A, 1995. Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development*, 121: 3797 – 3807.

Matova N, Cooley L, 2001. Comparative aspects of animal oogenesis. *Dev. Biol.*, 231: 291 – 320.

Qi GJ, Lu F, Hu G, Wang FY, Gao Y, Lü LH, 2011. The application of ovarian dissection in the research on migratory insects in China. *China Plant Protection*, 31(7): 18 – 22. [齐国君, 芦芳, 胡高, 王凤英, 高燕, 吕利华, 2011. 卵巢解剖在我国迁飞昆虫研究中的应用. 中国植保导刊, 31(7): 18 – 22]

Qian RG, 1982. Preliminary report on ovarian anatomy and its application in the Asia corn borer *Ostrinia furnacalis*. *Entomol. Knowl.*, 19(5): 15 – 17. [钱仁贵, 1982. 玉米螟卵巢解剖及应用初报. 昆虫知识, 19(5): 15 – 17]

Wang XH, Xu HF, Xu YY, Liu Y, Zhou Z, 2003. The structures and developmental progress of reproductive system of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), and their use in forecast. *Acta Phytophyl. Sin.*, 30(3): 261 – 266. [王宪辉, 徐洪富, 许永玉, 刘勇, 周真, 2003. 甜菜夜蛾雌性生殖系统结构、发育分析及在测报上的应用. 植物保护学报, 30(3): 261 – 266]

Wheeler D, 1996. The role of nourishment in oogenesis. *Ann. Rev. Entomol.*, 41: 407 – 431.

Wu KM, Guo YY, Wu Y, 2002. Ovarian development of adult females of cotton bollworm and its relation to migratory behavior around Bohai bay of China. *Acta Ecol. Sin.*, 22(7): 1020 – 1023. [吴孔明, 郭予元, 吴燕, 2002. 环渤海湾地区棉铃虫成虫的卵巢发育特点及与迁飞行为的关系. 生态学报, 22(7): 1020 – 1023]

Xu Y, Fang F, Chu Y, Jones D, Jones G, 2002. Activation of transcription through the ligand-binding pocket of the orphan nuclear receptor ultraspiracle. *Eur. J. Biochem.*, 269: 6026 – 6036.

Yao Q, Zhang ZT, 1999. Research progress on the migratory insects in China. *Entomol. Knowl.*, 36(4): 239 – 243. [姚青, 张志涛, 1999. 迁飞昆虫的研究进展. 昆虫知识, 36(4): 239 – 243]

Zhang XX, Lu ZQ, Geng JG, 1979. Female adult anatomy and its application in forecasting in the rice leaf roller *Cnaphalocrocis medinalis*. *Entomol. Knowl.*, 16(3): 97 – 99. [张孝羲, 陆自强, 耿继国, 1979. 稻纵卷叶螟雌蛾解剖在测报上的应用. 昆虫知识, 16(3): 97 – 99]

Zhao XC, Feng HQ, Wu B, Wu XF, Liu ZF, Wu KM, Neil M, Jeremy N, 2009. Does the onset of sexual maturation terminate the expression of migratory behaviour in moths? A study of the oriental armyworm, *Mythimna separata*. *J. Insect Physiol.*, 55(11): 1039 – 1043.

(责任编辑: 赵利辉)